Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Granulozytenfunktionen bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom unter AVC-Therapie

Untersuchung von Adhäsion, Phagozytose und NBT-Reduktion

INAUGURAL — DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
RENATE KARUTZ, geb. Knapp
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Granulozytenfunktionen bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom unter AVC-Therapie

Untersuchung von Adhäsion, Phagozytose und NBT-Reduktion

INAUGURAL — DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
RENATE KARUTZ, geb. Knapp
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1983

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Chr. Benöhr
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL, METHODEN UND AUSWAHL DER PATIENTEN	5
2.1.	Patientenkollektive	5
2.2.	Normkollektive	6
2.3.	Therapie	6
2.4.	Beschreibung der Untersuchungsmethoden	7
2.4.1.	Adhäsivität nach Mc Gregor	8
2.4.2.	Phagozytose von Staph. aureus	9
2.4.3.	NBT-Test	10
2.5.	Statistik	11
2.6.	Material	12
3.	ERGEBNISSE	14
3.1.	Adhäsion	14
3.2.	Phagozytose	18
3.3.	NBT-Test	21
4.	DISKUSSION	24
4.1.	Adhäsion	24
4.2.	Phagozytose	27
4.3.	NBT-Test	29
4.4.	Wirkungsmechanismus, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen der verwendeten Zytostatika	31
4.4.1.	Vincristin	31
4.4.2.	Adriamycin	33
4.4.3.	Cyclophosphamid	36
4.5.	Diskussion der Befunde	38
5.	ZUSAMMENFASSUNG	41
6.	LITERATUR	43

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0112

1. EINLEITUNG

Die menschlichen Granulozyten haben eine wichtige Funktion in der Infektabwehr des Organismus. Nach dem Austritt aus dem Knochenmark verbleiben ihnen im Blut nur wenige Stunden. Treten sie einmal in das Gewebe über, kehren sie nicht mehr in das Gefäßsystem zurück. Bei lokaler Gewebsentzündung heften sich die Granulozyten vermehrt an das Endothel der dort befindlichen Blutgefäße an und treten in das Gewebe aus. Dieser Vorgang wird durch lokale Kapillarerweiterung, durch Permeabilitätserhöhung der Kapillarwände und durch verlangsamte Kapillarflußgeschwindigkeit erleichtert.

Die Durchwanderung der Granulozyten durch die Kapillarwand wird durch spezifische leuko- oder chemotaktische Faktoren gesteuert. Entsprechend dem Konzentrationsgefälle dieser Substanzen wird die Wanderungsrichtung der Granulozyten bestimmt. Durch das Zusammenwirken mit Faktoren des Komplementsystems, verschiedenen bakteriziden Substanzen und spezifischen Antikörpern sind die Granulozyten dann in der Lage, Mikroorganismen zu phagozytieren und anschließend intrazellulär abzutöten. Dabei besteht die Aufgabe der Granulozyten ganz überwiegend in der Ausschaltung der Bakterien. Sie stellen damit den wichtigsten zellulären Abwehrmechanismus dar.

Die beim Entzündungsvorgang notwendigen Funktionen der Granulozyten lassen sich nach ihrem zeitlichen Auftreten in Einzelteilschritte zergliedern:

UNIV. LEIDEN BIBL.

1. Adhäsion
2. Chemotaxis und Migration
3. Phagozytose
4. Abtötung (Killing)

Adhäsion beschreibt die Fähigkeit, sich an das Gefäßendothel anzuheften. Diese Fähigkeit besitzen alle Blutzellen, allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Bei den Leukozyten wurde auch für die Fähigkeit zur Adhäsion eine Abhängigkeit von chemotaktischen Faktoren gefunden.

Chemotaxis und Migration sind schwer voneinander zu trennen: mit Hilfe von Rezeptoren auf ihrer Membranoberfläche sind die Leukozyten in der Lage, in Richtung maximaler Konzentration einer chemotaktisch aktiven Substanz zu wandern, da sie über eine ungeheure Beweglichkeit und Verformbarkeit verfügen. Ihre eigentliche Aufgabe im Sinne der körpereigenen Abwehr beginnt erst, wenn sie am Entzündungsherd angelangt sind. Dort müssen sie die Bakterien in sich aufnehmen, phagozytieren. Durch Pseudopodienbildung, Einstülpung der Zellmembran und anschließende Vakuolenbildung um den zu phagozytierenden Partikel nehmen sie diesen in sich auf. Nach der Ingestion müssen die Bakterien intrazellulär abgetötet werden. Dieses geschieht mit Hilfe von bakteriziden Substanzen aus den Granula und durch die stark bakteriziden Agentien H_2O_2 und O_2^-.

Diese Einzelschritte der granulozytären Funktionen lassen sich heute durch zahlreiche verschiedenartige Tests experimentell nachweisen (7, 54, 19, 26, 18 ...).

Besonderes Interesse finden Untersuchungen der leukozytären Funktionen heute in der Onkologie, da bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen Einschränkungen der Phagozytose, des Killing und der Chemotaxis beschrieben wurden (47, 77, 28, 29, 36, 70).

Von besonderer praktischer Bedeutung ist der Effekt von Zytostatika, die im Zusammenhang mit Leukopenie zu einer erhöhten Infektanfälligkeit der Patienten beitragen können. Uns interessierte in diesem Zusammenhang die Wirkung einzelner Zytostatika auf in vitro meßbare granulozytäre Funktionen. Wir haben dazu ein verhältnismäßig gut charakterisiertes Kollektiv von Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom ausgewählt, die in der med. Univ. Klinik Tübingen nach dem sogenannten AVC-Schema (n. JONES et al. 35), bestehend aus Adriamycin + Vincristin + Cyclophosphamid, behandelt wurden (84, 85). Die Granulozyten der Patientinnen wurden vor und nach Injektion von Adriamycin und Vincristin isoliert und verschiedenen Funktionstests unterzogen.

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Untersuchung, die die folgenden zwei Fragen bearbeitet:

1. Lassen sich Einflüsse des metastasierenden Mamma-Carcinoms auf die Granulozytenfunktionen Adhäsion, Chemotaxis/Migration, Phagozytose und intrazelluläre Abtötung zeigen?

2. Welchen Effekt hat die beschriebene Zytostatikatherapie auf die einzelnen Granulozytenfunktionen und wieweit ist dieser Effekt reversibel?

Da die Untersuchungen sehr zeitaufwendig waren, wurden sie gemeinsam mit Markus Karutz durchgeführt, der speziell Chemotaxis und Migration bearbeitete.

Die Patientenkollektive beider Arbeiten, sowie die untersuchten Blutproben sind identisch. Voruntersuchungen deuteten darauf hin, daß ein Effekt der zytostatischen Therapie auf granulozytäre Funktionen bereits nach wenigen Stunden zu beobachten ist. Deshalb wurden die Patientenkollektive so eingeteilt, daß vor allem die ersten beiden Tage genau erfaßt werden konnten. Wiederholte Blutentnahmen für Longitudinalstudien zur Abschätzung der intraindividuellen Veränderung ließ das Allgemeinbefinden der Patientinnen nicht zu.

2. MATERIAL, METHODEN UND AUSWAHL DER PATIENTEN

2.1. Patientenkollektive

Insgesamt wurden 43 Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom im Alter zwischen 37 und 75 Jahren untersucht. Entsprechend der zytostatischen Vorbehandlung wurden 4 verschiedene Gruppen gebildet.

In der ersten Gruppe (vT) wurden 17 Patienten untersucht, die bisher keine Zytostatika erhalten hatten, oder bei denen der letzte Zytostatika-Stoß mindestens 4 Wochen zurücklag.

Die zweite Gruppe (1T) bestand aus 12 Patienten, bei denen jeweils einen Tag vor der Blutentnahme Adriamycin und Vincristin, jeweils i.v., injiziert worden waren.

Gruppe drei (2T) bestand aus 5 Patientinnen, bei denen die Untersuchungen zwei Tage nach Therapiebeginn durchgeführt wurden.

Die vierte Gruppe (3-15T) faßte alle Patientinnen zusammen, bei denen der Beginn des jeweiligen Zytostatikastoßes mindestens drei und höchstens 15 Tage zurückliegt. Diese Gruppe bestand aus 9 Patientinnen.

Eine Unterteilung nach Ovarektomie, Lebensalter, Vorbehandlung mit Tamoxifen und Ausmaß der Metastasierung wurde nicht vorgenommen.

2.2. Normkollektive

Zum Vergleich zu den Patientenkollektiven wurden zwei Gruppen von Probanden gebildet.

Die erste Normgruppe (1NG) bestand aus jeweils 10 gesunden Männern und Frauen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren.

Die zweite Normgruppe bestand aus 20 weiblichen Probanden im Alter zwischen 35 und 70 Jahren, die nicht an Stoffwechselstörungen, Entzündungen oder malignen Erkrankungen litten. Es wurden beide Gruppen gebildet, um Alters- und Geschlechtsunterschiede auszuschließen.

2.3. Therapie

Bei allen untersuchten Patientinnen mit Mamma-Carcinom kam das AVC-Schema zur Anwendung (84, 85), das nach folgendem Plan verabreicht wurde:

Adriblastin 40 mg/m^2 i.v. Tag 1
Vincristin 1 mg/m^2 i.v. Tag 1
Endoxan 200 mg/m^2 p.o. Tag 3-6

Dieser Zyklus wurde alle 4 Wochen wiederholt.

2.4. Beschreibung der Untersuchungsmethoden

Blutmenge:

Jedem Probanden wurden 20 ml Citratblut (3 ml Citrat + 17 ml Blut) in Plastik-Einmalspritzen venös entnommen und sofort nach Entnahme verarbeitet. Diese Menge reichte aus, die in der vorliegenden Arbeit,sowie die von M. Karutz beschriebenen Tests durchzuführen.

Herstellung der Granulozytensuspension:

Das Zitratblut wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. In graduierten Röhrchen wurden jeweils 8 ml Blut-Kochsalzgemisch über 3 ml Lymphopräp (Nyegaard & Co., Norwegen) unter Verwendung einer 10 ml Plastikspritze und einer 1,6 Storz-Kanüle überschichtet. Dabei mußte beachtet werden, daß an der Grenzschicht zwischen Blut und Lymphopräp beim Überschichten keine Wellen entstehen und sich die beiden Flüssigkeiten nicht durchdringen.

Nach exaktem Auswiegen der Röhrchen wurde der Überstand abgesaugt und die unterste, rote Schicht, in der die Granulozyten mit enthalten sind, mit dem Nährmedium RPMI aufgeschüttelt. Durch dieses Überschichten mit Lymphopräp und die anschließende Zentrifugation wurden Lymphozyten und Monozyten von den Granulozyten getrennt, die jetzt nur noch mit den Erythrozyten gemischt waren. Die Suspension wurde in einer Silenta Zentrifuge 10 Min. bei 1500 U/Min. zentrifugiert und der Überstand wieder abgesaugt. Das verbliebene Granulozyten-Erythrozytengemisch wurde wieder im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt; jeweils 10 ml wurden über 20 ml

Ronpacon-Dextranlösung (Herstellung siehe Anhang) mit einer exakten Dichte von 1085, überschichtet. Nach ca. 1 h hatten sich die Erythrozyten abgesetzt. Die oberste, schwach rötliche Schicht, in der sich die Granulozyten befanden, wurde mittels einer Pasteurpipette abgehebert und erneut mit RPMI aufgeschwemmt. Es wurde wieder in der Silentazenrifuge zentrifugiert, diesmal bei 3000 U/Min. Der Überstand wurde abgekippt, das Sediment wurde mit RPMI auf ein Volumen von 1.2 ml verdünnt, und die Zellzahl der Suspension bestimmt. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von etwa 12.5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.4.1. Adhäsivität nach Mc Gregor

Zur Bestimmung der Granulozytenadhäsion wurde eine silikonisierte Pasteurpipette (Länge 150 mm, Ø 5 mm) mit 80 mg Nylonwolle (Fenwal Lab) gefüllt und vorsichtig 20 mm hoch gestopft (Abb. 1).

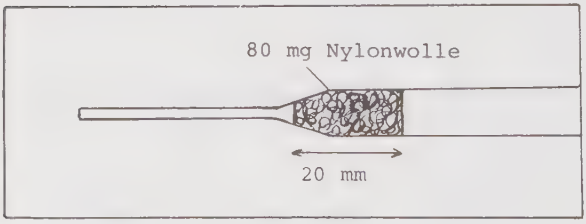


Abb. 1

Die präparierten Pipetten wurden 30 Min. in einen Wärmeschrank mit 37°C gelegt und dann senkrecht mit der Spitze nach unten in einem Pipettenständer aufgestellt. 1 ml Zitratblut wurde vorsichtig aufgetragen und in einem Plastikhütchen aufgefangen. Pro Patient wurden drei Parallelversuche durchgeführt.

Zur Auswertung wurden die Zahlen der Leukozyten vor und nach Durchlaufen durch die Säule bestimmt und jeweils im nach Pappenheim gefärbten Ausstrich der Anteil der Granulozyten ausgezählt. Die Auswertung geschah nach der Formel:

$$\text{Adh \%} = 100 - \frac{Z_n \times \text{Segm \%}_n}{Z_v \times \text{Segm \%}_v} \times 100$$

Wobei die Abkürzungen folgende Bedeutung haben:

Z_n = Zellzahl nach Durchlaufen der Pipette

Z_v = Zellzahl vor Durchlaufen der Pipette

$\text{Segm\%}_n$ = prozentualer Anteil der Granulozyten am Differentialblutbild nach Durchlaufen der Pipette

$\text{Segm\%}_v$ = prozentualer Anteil der Granulozyten am Differentialblutbild vor Durchlaufen.

Aus den Werten der drei Parallelversuche wurden jeweils die Mittelwerte berechnet.

2.4.2. Phagozytose von Staph. aureus

Hierzu wurde die unter 2.4. beschriebene Granulozytensuspension verwendet. 0,1 ml dieser Suspension wurden mit 0,5 ml ABO-Serum und Staphylokokkenreagenz (Behrung AG,

Marburg), gemischt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, muß ein konstantes Verhältnis von Granulozyten zu Bakterienzahl bestehen. Das für unseren Ansatz optimale Verhältnis betrug $12,5 \times 10^6$ Zellen/1 µl Bakteriensuspension. Bei geringeren Zellkonzentrationen mußte die Bakterienmenge entsprechend vermindert werden nach der Beziehung:

$$\text{Bakterienmenge} = \frac{\text{Zellzahl}}{12,5 \times 10^6} \quad (\mu l)$$

Der Ansatz wurde 6 Min. bei 37°C inkubiert. Dann sedimentierten die Zellen in einer Sayk-Apparatur, so daß eine für die Auswertung genügend hohe Zelldichte gewährleistet war.

Nach Pappenheim-Färbung des Präparates wurden die Bakterien in hundert neutrophilen Granulozyten ausgezählt und aus diesem Wert der Phagozytoseindex ≙ Anzahl der phagozytierten Bakterien pro Zelle errechnet.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert der beiden Einzelergebnisse bestimmt.

2.4.3. NBT-Test

Zur Durchführung wurden die Reagenzien für den semiquantitativen Nitroblautetrazolium-Reduktionstest an neutrophilen Granulozyten verwendet, der von Sigma Chemical Comp. hergestellt wird. Im einzelnen kamen folgende Reagenzien zur Anwendung: NBT vial stock Nr. 8410 10 (enthält Nitroblautetrazolium, lyophylisiert mit Phosphatpuffer und Natriumchlorid). Vials, glass with caps,

stock Nr. 840 50 (silikonisierte Gläschen für die Inkubation der Mischung), Wrights stain buffered stock Nr. 8410 100 (eine Methanollösung von Wrights stain 2,5 mg/l, gepuffert auf einen pH von 6,7).

Ausführung:

1 ml Citratblut wurde mit 1 ml NBT-Reagenz gemischt und jeweils 15 Min. bei 37°C und bei Zimmertemperatur nacheinander inkubiert. Anschließend wurde ein Ausstrich angefertigt und mit Wright's stain gefärbt.

Zur Auswertung wurden 100 neutrophile Granulozyten in NBT-positive und NBT-negative Zellen differenziert. Dabei wurden unter mikroskopischer Beobachtung grobschollige blaue Formazaneinlagerungen als NBT-positiv, feinkörnige Formazaneinlagerungen und unbeladene Zellen als NBT-negativ bewertet.

Der NBT-Index pro Patient ergab sich als Mittelwert aus jeweils 2 Ansätzen. Alle Präparate wurden von je 2 verschiedenen Personen ausgezählt.

2.5. Statistik

Die Ergebnisse des Adhäsionstests, des Phagozytosetests und des NBT-Tests wurden jeweils multiplen t-Tests und wenn sich signifikante Unterschiede ergaben, auch einem Einzelvergleich nach Bonferoni unterworfen. p wurde hierbei als 0,05 gewählt. Für die freundliche Betreuung bei der statistischen Auswertung sind wir Prof. Dr. K. Dietz, Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen zu Dank verpflichtet.

2.6. Material

Dextran: 5 Amp. Sodium Metrizoate à 20 ml + 128,65 ml aqua dest + Dextran 20,1 g + 335 ml a.d. Sodium Metrizoate: Metrizoate Solution 75 % w/v; Packung zu 5 x 20 ml; Nyetaard & Co. A/S Oslo, Norway. Density: 1,46 g/ml (20°C)
Dextran: Dextran T 500; Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden

May-Grünwalds Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung, enthält Methanol), Art. Nr. 1424

Filter für Saykkammer: Selekta, Nr. 595, Ø 9 mm, Carl Schleicher & Schüll RFP

Lymphopräp: Density 1,077 g/ml (Mischung aus: Sodium Metrizoate + Ficoll, density 1,077 + 0,001 g/ml); Nyegaard & Co. A/S, Oslo, Norway

Pasteurpipetten: Länge 15 cm, Ø 5 mm

Nylonwolle: herausgenommen aus: Leuko-Pak, Leukocyte Filter, Code 4C2401, Fenwal Lab., Div. of Travenol Lab, Inc.,Deerfield Illinois, 60015, USA

RPMI: RPMI 1640 (IX) with L-Glutamine, Cat. No. 1876, Batch No. K900103, Gibco Europe, Glasgow, Scotland

Serum: ABO-Serum, Seromed, München, Germany

Silikon: Silikonlösung Serva 35130, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany

Staphylokokken: Staphylokokken-Reagenz, St. aureus Newman D26, Koagulase neg., Clumping Factor pos. aus: FSP-Testbesteck, Nr. 135, ORKX 19605525/K (1742), Behringwerke AG, Marburg, Germany

Thrombogenz Plaxan, Biotechnik GmbH, 2000 Hamburg 65

Zentrifugen: Silenta Roto, Type 500 A;Hettich Rotixa, Bj. 1971

3. ERGEBNISSE

3.1. Adhäsion

Die höchste Granulozyten-Adhäsion mit einem mittleren Wert von 58,73 $\pm$ 8,14 % wurde in der 1. Normgruppe (1NG) gefunden (s. Tab. 1). Die zweite Normgruppe (2NG) war mit 47,29 $\pm$ 11,3 % im Einzelvergleich nach Bonferoni signifikant niederiger als 1NG. Dabei ist p wie in allen folgenden Tests 0,05 (Tab. 2). Die Patientengruppe vT zeigte mit einem mittleren Wert von 52,79 $\pm$ 8,08 % keinen signifikanten Unterschied zu den Normgruppen. Tab. 1 zeigt an den beiden ersten Tagen nach Beginn der zytostatischen Therapie einen deutlichen Abfall der Granulozyten-Adhäsion, die jedoch in den beiden Patientengruppen 1T und 2T stark streute, so daß eine erhebliche Standardabweichung resultierte. Ein signifikanter Unterschied ergab sich daher nur zwischen den Kollektiven vT und 1T (Tab. 2). Abb. 2 gibt einen graphischen Überblick über die Granulozyten-Adhäsion der verschiedenen Patientinnen-Gruppen unter dem Einfluß zytostatischer Therapie. Daraus ist zu ersehen, daß vom dritten Tag an eine Normalisierung der Adhäsionswerte erfolgt.

Tabelle 1: Ergebnisse beim Adhäsionstest

Nr.	1.NG	2.NG	vT	1T	2T	3-15T
1	64,1	53	66,8	57,3	37	53,2
2	55	39	48,3	24,2	59,9	48
3	54	44,3	61,9	17,5	34	32
4	57,3	43	52	38,5	15	67,8
5	53	58,6	50,8	60	40,3	50,4
6	66	57,5	51,2	31,7		47,4
7	72,1	54	56,3	33		42,1
8	54,4	45	56,4	53		57
9	49	30	47	47,7		
10	66,2	24,3	55	29		
11	65,6	38	54,7	27,6		
12	52,8	48,2	42,8	16,2		
13	41,5	50	46			
14	57,2	74,2	40			
15	49,9	39	63,2			
16	70,4	47,3	53,8			
17	66,3	46,3	41,3			
18	64,6	60,8				
19	56,5	46				
	1115,9	898,5	897,5	435,7	186,2	397,9
$\bar{x}$	58,73	47,29	52,79	36,31	37,24	49,74
s	8,14	11,33	8,08	15,02	16,03	10,51
n	19	19	17	12	5	8

Tabelle 2: Auswertung der Ergebnisse des Adhäsionstests mit dem Einzelvergleich nach Bonferoni

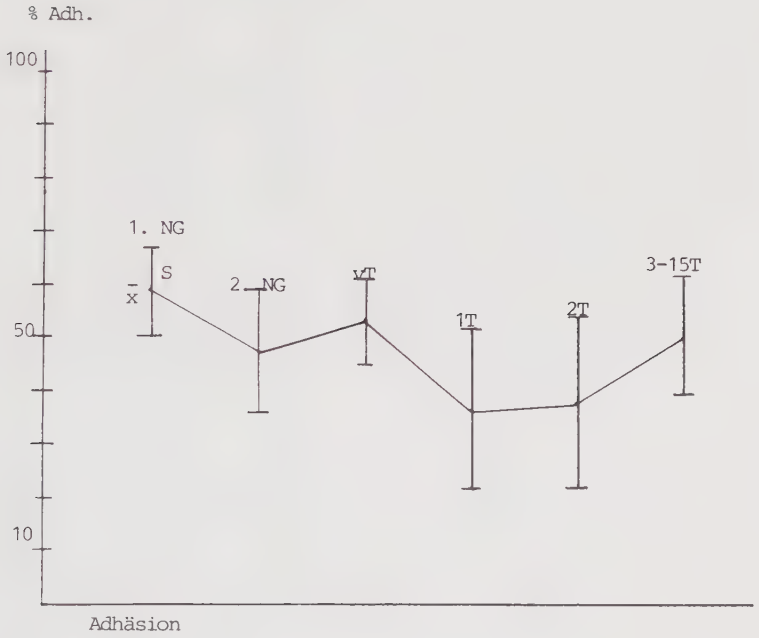
verglichene Gruppen	krit. Differenz	emp. Diff.	Signifikanz
1NG - vT	11,14	5,94	
1NG - 3-15T	14,07	8,99	
1NG - 2NG	10,83	11,44	+
1NG - 2T	16,78	21,5	+
1NG - 1T	12,31	22,43	+
vT - 3-15T	14,31	3,05	
vT - 2NG	11,14	5,5	
vT - 2T	16,98	15,63	
vT - 1T	12,59	16,49	+
3-15T - 2NG	14,07	2,45	
3-15T - 2T	19,03	12,58	
3-15T - 1T	15,44	13,44	
2NG - 2T	16,78	10,13	
2NG - 1T	12,31	10,99	
2T - 1T	17,77	0,86	

t x s = 33,38 (t = Prüfgröße, s = Standardabweichung)

$$\text{krit. Differenz} = t \times s \times \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}}$$

Abb. 2

Adhäsionstest nach Mc Gregor:
Mittelwerte und Standardabweichungen
der zu vergleichenden Kollektive
($\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung)



3.2. Phagozytose

Die Phagozytose von Staph. aureus durch Granulozyten war wiederum in der Gruppe 1NG mit einem mittleren Wert von 8,85 $\pm$ 2,95 am höchsten, während die zweite Normgruppe (2NG) einen Wert von 6,92 $\pm$ 1,57 aufwies (Tab. 3). Die Ergebnisse der Patientinnengruppen vor Therapie (vT) und 1 Tag nach Beginn (1T) waren mit 7,2 $\pm$ 1,31 bzw. 7,12 $\pm$ 2,79 nahezu gleich. Erst am zweiten Tag nach Zytostatika-Injektion ließ sich ein deutlicher Abfall des Phagozytose-Index mit 3,62 $\pm$ 2,06 nachweisen (Tab. 3, Abb. 3), der jedoch im Einzelvergleich nach Bonferoni nur gegenüber 1NG signifikant war (Tab. 4). Dabei ist aber auf die niedrigen Probandenzahlen in den Kollektiven hinzuweisen, die einen strengen Vergleich nicht erlauben. Leider konnte in dieser Versuchsserie nur ein Teil ausgewertet werden, da sich nach Abschluß der Serie herausstellte, daß das Staphylokokken-Reagenz zwischenzeitlich mit anderen Bakterien verunreinigt war.

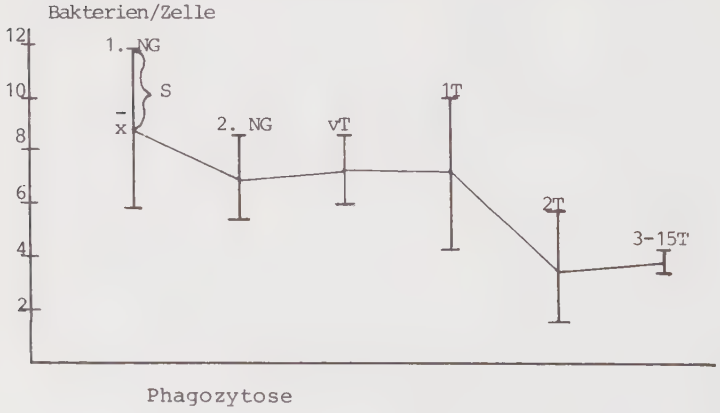
Tabelle 3: Ergebnisse im Phagozytosetest mit Staphylokokkus aureus.

Nr.	1.NG	2.NG	vT	1T	2T	3-15T
1	12,91	6,34	6,05	7,58	5,43	3,9
2	10,74	4,9	6,94	9,34	4,05	3,13
3	4,47	6,55	8,62	4,47	1,37	4,13
4	3,75	7,54		7,63		
5	10,1	5,9		8,6		
6	9,65	8,45		7,75		
7	8,5	10,51		11,4		
8	7,27	7,87		4,9		
9	9,15	7,82		7,4		
10	11,95	6,52		8,3		
11		7,25		0,95		
12		5,39				
13		4,95				
	88,57	89,99	21,66	78,32	10,85	11,16
$\bar{x}$	8,85	6,92	7,2	7,12	3,62	3,72
s	2,98	1,57	1,31	2,79	2,06	0,52
n	10	13	3	11	3	3

Tabelle 4: Auswertung der Ergebnisse des Phagozytosetestes im Einzelvergleich nach Bonferoni.

verglichene Gruppen	krit. Diff.	emp. Diff.	Signifikanz
1NG - vT	4,79	1,56	
1NG - 1T	3,18	1,72	
1NG - 2NG	3,01	1,92	
1NG - 3-15T	4,79	5,12	+
1NG - 2T	4,79	5,22	+
vT - 3-15T	5,94	3,56	
1T - 3-15T	4,75	3,4	
2.NG - 3-15T	4,63	3,2	

Abb. 3: Phagozytose v. Staph. aureus: Mittelwerte und Standardabweichungen der zu vergleichenden Kollektive. ($\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung)



3.3. NBT-Test

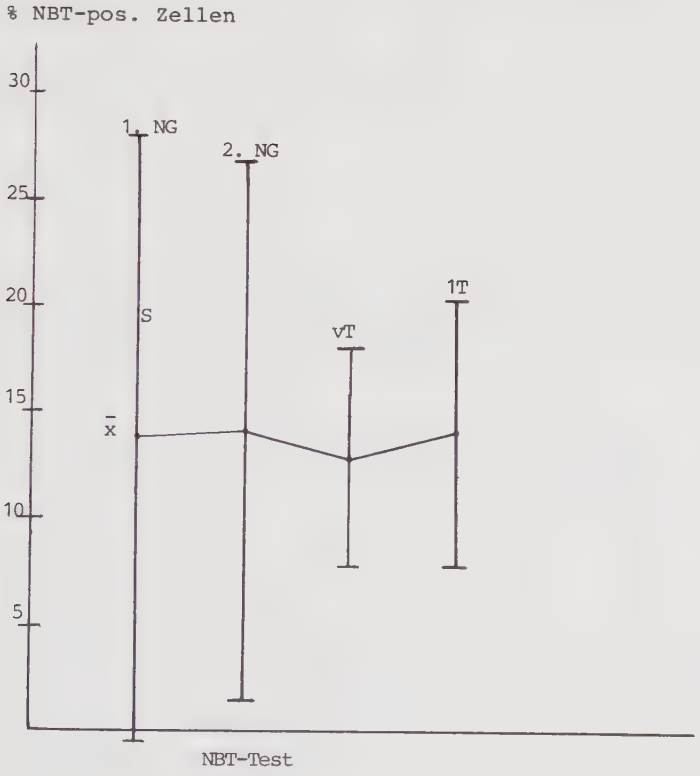
Der in der Literatur häufig als Test der Granulozytenfunktion, spez. der intrazellulären Bakterienabtötung bezeichnete NBT-Test wurde in unserer Versuchsreihe miterfaßt, um einen Vergleich mit den granulozytären Einzelfunktionen zu ermöglichen. Obwohl der Test genau nach vom Hersteller angegebenen Bestimmungen durchgeführt wurde, und die Ausstriche unabhängig von mindestens zwei Personen ausgewertet wurden, ergaben sich so hohe Streuungen in den einzelnen Kollektiven, daß eine statistisch zuverlässige Aussage über die Ergebnisse nicht möglich war. Die Mittelwerte der Kollektive 1NG, 2NG, vT u. 1T unterschieden sich auch numerisch nur unwesentlich, so daß uns eine weitere Testdurchführung nicht sinnvoll erschien (Tab. 5, Abb. 4).

Tabelle 5: Ergebnisse nach dem NBT-Test

Nr.	1.NG	2.NG	vT	1T	2T	3-15T
1	25	14	7	12	3	23
2	7	8,5	11	7		
3	7	2,5	21	9		
4	7	4	13	16		
5	5	29	12	15,5		
6	3	33		24,5		
7	3	31				
8		13	16			
9		52	1			
10	24	7,5				
11	26	22,5				
12	3	45				
13		6				
14		3,5				
15		20				
16		4				
17		9				
18		7,5				
19		4				
	165	268	64	84	3	23
$\bar{x}$	13,75	14,11	12,8	14		
s	14,33	12,61	5,12	6,24		
n	12	19	5	6	1	1

Die Ergebnisse sind im multiplen t-Test nicht signifikant. Der Einzelvergleich nach Bonferoni wurde daher nicht durchgeführt.

Abb. 4: NBT-Test: Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichung der zu vergleichenden Kollektive ($\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung)



4. DISKUSSION

Die zelluläre Abwehr des Körpers ist besonders an Granulozyten und Monozyten gebunden. Die Granulozyten haben eine wichtige Frühfunktion, da sie sich aktiv bewegen, einen Entzündungsherd rasch erreichen und Bakterien direkt vernichten können. Vom Erkennen eines Fremdpartikels bis zu Phagozytose und Abtötung sind jedoch mehrere Schritte auszuführen, die heute im einzelnen weitgehend bekannt sind.

4.1. Adhäsion

Einen entscheidenden ersten Schritt stellt die Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel dar, durch den die Migration durch die Gefäßwand als Antwort auf einen chemotaktischen Reiz möglich wird (63). Die die Adhäsion auslösende Ursache und ihre pathobiochemische und -physiologische Grundlage ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Adhäsion ist keine spezifische Funktion der Granulozyten, sondern auch den Monozyten (45), Thrombozyten (45, 19) und - in geringerem Ausmaß - Lymphozyten möglich (19, 45). Sehr geringe Adhäsion dagegen haben Erythrozyten (45). Während die unreifen Granulozytenvorstufen nur minimale Adhärenz zeigen (62), weisen die reifen Granulozyten in Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren starke Adhärenzunterschiede auf. So ist die Anwesenheit von divalenten Kationen, speziell Ca^{2+} und Mg^{2+} (68) eine unbedingte Voraussetzung, wie durch Versuche mit EDTA nachgewiesen wurde (1, 19, 45, 66, 68, 69). Die Energie für den Adhäsionsvorgang wird aus der Glykolyse zur Verfügung gestellt (19, 45, 46). Erythrozyten hingegen und

Thrombozyten - auch mit erhöhter Aggregationsbereitschaft - sind ohne Einfluß auf die Adhäsion der Leukozyten (44, 59). Optimale Granulozytenadhäsion besteht bei Temperaturen zwischen 25 und 44°C (14).

TALYOR (80) beschrieb 1960 zwei verschiedene Typen von Adhäsion:

a) Schnelle Anheftung und Ausbreitung bei Kontakt mit reinem Glas als rein passiven physiko-chemischen Vorgang,

b) eine weniger feste und langsamer ablaufende Adhäsion, die nur von lebenden Zellen in Abhängigkeit von divalenten Kationen ausgeführt wird und nur in Anwesenheit von Serum, Immunglobulinen oder/und Komplementfaktoren oder an mit Protein oder anderen Makromolekülen bedeckten Oberflächen geschieht.

Ein historischer Abriß dieses Forschungsgebietes findet sich bei GRANT, 1965 (24). Demnach wurden Adhäsion und Emigration der Leukozyten 1824 von Dutrochet erstmals beobachtet. Gut reproduzierbare Experimente zur Adhäsion von Leukozyten wurden 1961 durch GARVIN (19) mit Hilfe silikonisierter Glasperlen durchgeführt, die auf eine dünne Schicht silikonisierter Glaswolle in einer Glasspitze aufgeschichtet wurden. Unter Verwendung von Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,1 mm wird diese Methode bis heute verwendet (59). Die von MCGREGOR (45) eingeführte Methode benutzt statt Glasperlen Nylonwolle und statt einer Glasspritze silikonisierte Pasteurpipetten. Als Vorteile werden genannt: der relativ geringe Materialaufwand und Blutbedarf, die sehr einfache Durchführbarkeit und die Möglichkeit, je nach Fragestellung

durch Variation der Nylonwollemenge den Normbereich beliebig zu verschieben. Von Nachteil sind die nicht immer identischen Stopfbedingungen der Nylonwolle in den Pasteurpipetten. Vollblut kann in gleicher Weise wie Granulozytensuspension eingesetzt werden. Andere Untersuchungsverfahren sind die Adhäsion an Petrischalen, deren Quantifizierung mit Hilfe des Myeloperoxidasehaltes der adhärenten Zellen durchgeführt werden kann (15) oder die Bestimmung der Leukozytenadhäsion an Glaskapillarröhrchen nach Zentrifugation (8).

Wir haben nach Vergleich der verschiedenen Methoden die von MCGREGOR angegebene Adhäsionsmessung eingeführt, weil sie gute Reproduzierbarkeit, schnelle technische Ausführung und einfache Variationsmöglichkeit zeigte. Da nach Voruntersuchungen bei den von uns untersuchten Patienten keine Steigerung, sondern eher eine Verminderung der Leukozytenadhäsion zu erwarten war, wählten wir einen Meßbereich mit relativ hoher mittlerer Adhäsion. Versuche mit verschiedenen Nylonwollmengen zwischen 50 und 120 mg und Inkubationstemperaturen zwischen 20 und 37^{o}C ergaben als für unser Vorhaben günstigste Parameter pro Versuch 80 mg Nylonwolle und Inkubation bei 37^{o}C.

Entzündliche Erkrankungen gehen generell mit einer erhöhten Adhäsion der Granulozyten einher, wie aus Beobachtungen bei bakteriellen Prozessen, aber auch rheumatischen Entzündungen bekannt ist (37, 45). Die Infekt-induzierte Adhäsionssteigerung der Granulozyten läßt sich bereits innerhalb der ersten Stunde beobachten, ist wahrscheinlich durch Immunglobuline und Komplementfaktoren bedingt (37, 44) und normalisiert sich nach Abklingen einer Infektion rasch wieder. Verminderte Granulozytenadhäsion

wurde bei Leukämien beobachtet (62), während bei malignen Lymphomen und Soliden Tumoren die Adhäsion nicht gestört war (15, 49). Der Einfluß verschiedener chemischer Substanzen und Medikamente wurde eingehend untersucht. Herabgesetzte Adhäsion wurde durch Alkohol, Acetylsalizylsäure, Natriumsalizylat, Acetaminophen, Indomethacin, Phenylbutazon, Colchicin, Prednison, Bradykinin, Lidocain, Prostaglandin J2, Dibutyril-cAMP, Histamin und Theophyllin gefunden, keine Änderung durch Diphenylhydantoin, Furosemid, Diazepam, Chlorpromazin, Chloroquin und Dipyridamol (9, 44, 45, 46, 43, 59, 66, 71). Hingegen bewirkten Zymosan (44) und Endotoxin von E. Coli (71) eine vermehrte Adhäsion.

4.2. Phagozytose

Der Phagozytose-Vorgang ist ein komplexes Geschehen, das der Ausscheidung bzw. Vernichtung von Bakterien, Pilzen, Viren, aber auch gealterter bzw. transformierter Zellen dient. Zur Phagozytose gehören auf der einen Seite Ingestion (Aufnahme der Partikel) und Killing (intrazelluläre Abtötung), auf der anderen Seite aber auch vorbereitende Vorgänge wie Adhäsion, die durch humorale Faktoren erhöht werden kann, wie Chemotaxis (Anziehung von phagozytierenden Zellen durch spezifische Faktoren) und Opsonierung, bei der durch Immunglobuline und Komplementfaktoren die Oberflächenstrukturen von Bakterien verändert werden. Zur Phagozytose befähigt sind einerseits zirkulierende Granulozyten und Monozyten, andererseits gewebsständige Makrophagen in Milz, Lymphknoten, Lunge, Kupfersche Sternzellen der Leber oder Mikroglia.

Die Vorbedingungen für eine Phagozytosereaktion sind ausreichende Zahl und Funktionsfähigkeit von Granulozyten, Vorhandensein von Sialin-Säure und Tuftsin-Peptid für eine optimale Stimulation der Phagozyten, ausreichend vorhandene Energie (Glukoseverbrauch und Laktatproduktion steigen bei Phagozytose deutlich an), ATP und Calciumionen für die Aggregation der kontraktilen Proteine, sowie optimale Verhältnisse von pH (Optimum bei 7,3), Temperatur und Osmolarität (12, 50).

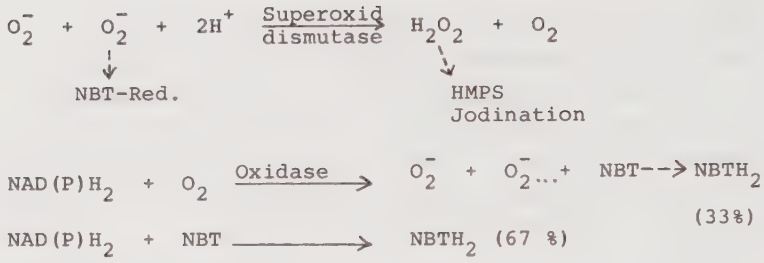
Phagozytosestörungen der Granulozyten wurden in den letzten Jahren zunehmend bei zahlreichen Krankheiten publiziert (61, 48, 47, 77). Dazu gehörten hämatologische Erkrankungen, wie Leukämien, Agranulozytose, zyklische Neutropenie, Plasmozytom, Makroglobulinämie, aber auch andere Erkrankungen, bei denen Infektabwehrschwäche bekannt ist, wie chronisch granulomatöse Erkrankung (73). Kollagenosen (56, 64, 76), rheumatoide Arthritis (64, 76), Urämie (64), Lebercirrhose (76). Eine durch Medikamente oder andere chemische Substanzen bedingte Einschränkung der Granulozytenphagozytose wurde ebenfalls häufig beschrieben. Die zur Phagozytosestörung führenden Vorgänge sind im einzelnen häufig nicht bekannt. Zu berücksichtigen ist, daß neben spezifischen Veränderungen der Bakterienaufnahme und -abtötung auch andere Störungen wie Neutropenie (z.B. durch Zytostatika), Fehler im Komplementsystem, Mangel an opsonierenden Eigenschaften eingehen können (4, 12, 31, 60, 74, 55, 76). Eine quantitative Messung der Phagozytose ist mit chemischen oder radioaktiv markierten Substraten möglich, die jedoch einen hohen technischen Aufwand erfordern (74, 75). Eine heute in zahlreichen Laboratorien gut standardisierte semiquantitative Methode verwendet Suspensionen von Staphylococcus aureus (81), wobei durch Vorversuche das optimale Verhältnis von Bakterien- zu Granulozytenzahl festgelegt

werden muß. Staphylococcus aureus erschien uns nach Vergleich mit Pneumokokken und Candida albicans wegen der höheren Ingestionsrate, der wesentlichen kürzeren Inkubationszeit und der geringen Störanfälligkeit des Ansatzes als geeignete Bakterienart. Der Phagozytoseindex wurde durch Auszählung der in 100 Granulozyten phagozytierten Bakterien bestimmt.

4.3. Zum NBT-Test

Reife und jugendliche Granulozyten (20, 58), wie auch Monozyten und Thrombozyten sind, solange sie eine intakte Zellmembran besitzen, in der Lage, den gelben Farbstoff Nitroblautetrazolium zu blauem Formazan zu reduzieren. Die NBT-Reduktion ist abhängig von der Phagozytoseaktivität, der Zellzahl, dem pH und der Temperatur (3, 33, 53, 58). Der NBT-Test ist eine indirekte Meßmethode für die oxidative Metabolisierung in diesen Zellen, die bei Phagozytose erhöht ist.

Der gelbe Farbstoff NBT wird intrazellulär aufgenommen und zu einem unlöslichen blauen Formazan reduziert. In den Phagozytosevakuolen wird es als blaue Scholle sichtbar. Die Lokalisation des Formazans in den Phagozyten ist sehr heterogen: teils ganz außerhalb, teils an der Membran und teils in den Vakuolen. Wahrscheinlich ist die membrangebundene Oxidase hauptsächlich für die Reduktion verantwortlich (53). Chemischer Reaktionsweg (nach 2,5):



Demnach werden also 33 % des NBT durch eine O_2-abhängige Oxidase und 67 % durch eine O_2-unabhängige NADH- oder NADPH-NBT-Reduktase katalysiert. Die Reduktion des NBT zu Formazan ist sowohl mikroskopisch wie auch photometrisch nach Extraktion mit Pyridin nachweisbar. Die verschiedenen Methoden und ein historischer Überblick findet sich in einer Zusammenstellung von M. JOHN (34). Der Farbstoff NBT wurde 1956 von TSOU et al. (82) synthetisiert und von BAEHNER und NATHAN 1968 (3) in die Diagnostik eingeführt. Bei der progressiven sepischen Granulomatose wurde in zahlreichen Untersuchungen (3, 5, 17, 34, 38, 41, 53) eine starke Verminderung der NBT-Reduktion gefunden. Widersprüchliche und wenig aussagekräftige Ergebnisse brachten Untersuchungen bei bakteriellen und abakteriellen Infektionen (41, 58, 72), Diabetes (57), Tumoren (27, 28, 29, 47, 77), malignen Lymphomen (17, 38), Granulozytenfunktionsstörungen von Neugeborenen (55, 61) und primärer Hyperlipidämie (33).

Erniedrigte NBT-Reduktionsraten wurden weiter gefunden nach Steroiden (42, 55), Phenylbutazon, Theophyllin, Prostaglandin E und einigen Sulfonamiden (55), widersprüchliche Ergebnisse nach Zytostatika (38, 56, 83).

Insgesamt kann man sagen, daß der NBT-Test lediglich bei der Diagnostik der progressiven septischen Granulomatose

wirklich aussagekräftig ist. Wir haben die standardisierten NBT-Reagenzien der Firma Sigma Chemical Company (67) verwendet, da uns die größte Schwierigkeit bei der Anwendung und Bewertung des NBT-Tests in seiner mangelhaften Standardisierung zu liegen scheint. Die mikroskopische Auswertung haben wir der spektralphotometrischen wegen des geringeren Blutbedarfs vorgezogen.

4.4. Wirkungsmechanismus, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen der verwendeten Zytostatika

4.4.1. Vincristin

Wirkungsmechanismus (nach 6, 10, 11, 22, 25, 79)

Vincristin wird aus Catharanthus roseus isoliert. Ebenso wie das chemisch fast identische Vinblastin, sowie Colchizin und Podophyllotoxin gehört es zu den Mitosegiften. Alle diese Substanzen haben eine hohe Affinität zu Tubulin, der entscheidenden Komponente der zellulären Mikrotubuli. Vincristin und Vinblastin binden sich im Verhältnis 1:1 an Tubulin, was zur Bildung regelmäßiger Kristalle und damit zur Auflösung der Mikrotubuli führt. Die Vincaalkaloide wirken deshalb stark zytotoxisch, weil durch die Auflösung der Mitosespindel in der Mitosephase die richtige Trennung der Chromosomen unmöglich wird und die Zellen in der Metaphase angehalten werden. Die Chromosomen verteilen sich dann im gesamten Zytoplasma oder treten in völlig irregulären Gruppierungen auf. Offensichtlich führt die Unfähigkeit, die Chromosomen richtig zu trennen, schließlich zum Zelltod.

Pharmakokinetik (nach 6, 22)

Vincristin wird nach oraler Applikation nur unvollständig und sehr unzuverlässig resorbiert. Nach i.v.-Verabreichung erreicht es innerhalb von Minuten einen maximalen Plasmaspiegel. Es wird zu über 50 % an die geformten Blutzellen gebunden, und zwar stärker an Thrombozyten als an Erythrozyten und Leukozyten. Es wird aktiv in die Zelle transportiert und existiert dort in mindestens zwei Fraktionen:

a) mit hoher Affinität zu Tubulin an dieses gebunden,
b) austauschbar und frei, und evtl.
c) an andere Proteine gebunden.

Vincristin wird ganz überwiegend über die Galle ausgeschieden. Schon nach ca. 2 h sind in der Leber maximale Konzentrationen erreicht, doch ist erst nach ca. 72 h die Exkretion völlig abgeschlossen.

Nebenwirkungen (nach 6, 10, 22, 25, 40)

Bei Vincristin stehen neben der Erzeugung einer relativ geringen Knochenmarksdepression die neurotoxischen Wirkungen ganz im Vordergrund. Weil es die Bluthirnschranke praktisch nicht passiert, handelt es sich fast ausschließlich um eine periphere Neuropathie mit Kribbeln in den Extremitäten, Muskelschwäche, Reflexverlust, Ataxie, Muskelkrämpfen, neuritischen Schmerzen, Obstipation u.a. Als Ursachen wurden Demyelinisierungen und Degenerationen von Nervenzellen beschrieben, zusätzlich auch Störungen im axonalen Transport. Eine reduzierte Ca-Aufnahme, ein unverändertes Phospholipidmuster und ein Anstieg der Plasma-CPK wurden ebenfalls gefunden.

Vincristin hemmt die Bildung von Antikörpern gegen Serumalbumin und verzögert Hypersensibilitätsreaktionen. Auch die IgM-Sekretion soll vermindert sein. Mitosegifte interferieren grundsätzlich mit der lysosomalen Degranulation und der Bildung von Verdauungsvakuolen, also Prozessen, die für die Phagozytose von entscheidender Bedeutung sind. Weil Vincristin eine so hohe Affinität zu Tubulin hat, ist es somit beteiligt an allen Veränderungen, die speziell mit diesem Protein zusammenhängen: an Veränderungen der Zellmorphologie, an Veränderungen der Beweglichkeit der Zellen, an allen Mitose- und Meiosevorgängen, an der Sekretion und am axonalen Transport. Erwünschte und unerwünschte Wirkungen liegen gerade bei Vincristin in ihrer Ursache extrem nahe beisammen.

4.4.2. Adriamycin

Wirkungsmechanismus (nach 10, 11, 14, 23, 52)

Das Anthracyclinantibiotikum Adriamycin wird aus dem Pilz Streptomyces peuceticus isoliert. Es sind heute zwei Wirkungsmechanismen bekannt, die seine zytotoxische Wirkung erklären können: Einerseits wird Adriamycin sehr rasch in die Zelle aufgenommen und bindet sich dort jeweils an zwei komplementären Basenpaare der DNA, indem es sich zwischen die beiden Stränge der Doppelhelix einschiebt. Dabei muß sich das Zucker-Phosphat-Rückgrat entspiralisieren. Es entsteht ein längeres, dünneres Molekül, das nun nicht mehr als Schablone für die Polymerase dienen kann. In sehr viel geringerem Maße bindet sich Adriamycin auch an die RNA.

Andererseits wird auch diskutiert, ob die Antitumoraktivität des Adriamycin in erster Linie auf seine zerstörenden Wirkungen auf die Zellmembran zurückgeführt werden muß. Aufgrund seiner Chinon-Hydrochinonstruktur nimmt Adriamycin gern Elektronen auf, um dann in eine Semichinonstruktur überzugehen. Wird Adriamycin zu Lebermikrosomen dazugegeben, so wird die Oxidation von NADPH und der Übergang von Elektronen auf O_2 begünstigt, was zur Entstehung von Superoxidradikalen (O_2^-) führt. Die DNA-Ketten werden also nicht nur durch die Einschiebung blockiert, sondern auch durch die Erzeugung freier Radikale in ihrer unmittelbaren Umgebung auseinandergerissen. Adriamycin wirkt in allen Zyklusphasen zytotoxisch, doch ist die S-Phase am sensibelsten.

Pharmakokinetik (nach 14, 23, 79)

Adriamycin verteilt sich nach i.v.-Applikation extrem schell. Schon nach 5 Min. sind Adriamycin und seine Metaboliten Adriamycinon und Adriamycinol in den Leukozyten des Blutes nachweisbar. Innerhalb der ersten zwei Tage nach der Applikation steigt ihre Konzentration dort noch weiter an und erreicht Werte, die 80-250-fach höher liegen als die Konzentration im Plasma (14). Ebenfalls innerhalb von Minuten verteilen sich Adriamycin und seine Metaboliten bevorzugt in die Organe Herz, Niere, Lunge, Leber, Milz, Knochenmark und Pankreas. Die Elimination erfolgt fast ausschließlich über die Leber und zwar triphasisch mit Halbwertszeiten von 12 Min., 3,3 h und 30 h. Adriamycin wird zum Teil unverändert, größtenteils jedoch in Form inaktivierter Metabolite ausgeschieden.

Nebenwirkungen (nach 23, 14, 16, 30, 40, 52, 51, 65, 78, 39)

Die starke, generelle Myelosuppression nach Gabe von Adriamycin, die besonders in der zweiten Therapiewoche in Form einer starken Leukopneie in Erscheinung tritt, die gastrointestinalen Störungen, wie auch die ausgeprägte Alopezie sind häufig, jedoch fast immer reversibel.

Nicht reversibel und charakteristisch für die Anthracyclinantibiotica ist die Erzeugung von Cardiomyopathien. Entscheidend ist hierbei nicht die akute Form, die direkt nach der Applikation auftritt und innerhalb eines Tages wieder verschwindet, sondern die chronische Cardiomyopathie, die als Folge der chronischen, kumulativen, streng dosisbezogenen Toxizität (ab 550 mg/m^2) des Medikamentes auftritt und eine Mortalität von etwa 50 % besitzt.

Beobachtet werden bei der akuten Cardiotoxizität Hypotonie, Tachykardie und Arrhythmien. Alles tritt innerhalb von Minuten nach der Applikation auf, spricht damit für die außerordentlich schnelle Verteilung des Adriamyxins ins Gewebe und soll hauptsächlich auf der Lipidperoxidation beruhen. Diese wird nicht vom Anthracyclinmolekül selbst verursacht, sondern erst, wenn der Chinonring der Anthracycline nach Reduktion und folgender Autooxidation die Bildung von H_2O_2 und evtl. auch anderer reaktiver O_2-Moleküle bewirkt, kommt es zur Lipidperoxidation und zu einer Steigerung des HMPS über die Oxidation von NADPH. Dabei binden sich die Anthracycline an verschiedene Phospholipide: so an Cardiolipin, den Hauptbestandteil der Mitochondrienmembran (52) und an Zellmembranen, was z.B. an Erythrozyten zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Membranveränderungen führt

(30, 52, 65). Auch an menschlichen Thrombozyten wurde eine Lipidperoxidation je nach Dosis des Anthracyclins gefunden (78). Bekannt ist auch, daß die Lipidperoxidation durch α-Tocopherol, Ubichinon, N-Acetylcystein und Acetylsalicylsäure spezifisch gehemmt werden kann (23, 51). Durch die direkte Bindung des Adriamycins an verschiedene Membransturkturen kommt es auch zu entscheidenden Permeabilitätsänderungen: zu einem Anstieg von Na^+ und Ca^{2+} in der Zelle, zu einer Hemmung der Aktivität der Na/K-Membran-ATPase und zu einer Hemmung aller Reaktionen, die Coenzym Q benötigen (16, 52). Als Ursache für die chronische Cardiomyopathie wird in erster Linie die Bindung des Adriblastins an die Zell-DNA mit einer folgenden Hemmung der RNA- und Proteinsynthese verantwortlich gemacht, außerdem - in geringerem Ausmaß - die Lipidperoxidation (16).

4.4.3. Cyclophosphamid

Da Cyclophosphamid nach dem oben beschriebenen AVC-Schema erst ab dem dritten Tag nach Therapiebeginn gegeben wird und in dieser Arbeit die ersten beiden Tage nach der Applikation von Adriamycin und Vincristin vorrangig betrachtet werden, seien hier zu Cyclophosphamid nur wenige, grundlegende Bemerkungen angeführt.

Cyclophosphamid ist der wichtigste Vertreter aus der Gruppe der alkylierenden Cytostatika. Es entfaltet seine Wirkung erst in Geweben mit sehr hoher Mitoserate, da erst dann die Reparaturenzyme der DNA nicht mehr in der Lage sind, die durch die kovalenten Bindungen an Cyclophosphamid kreuzweise verknüpften DNA-Einzelstränge wieder voneinander zu lösen und funktionsfähig zu machen.

Empfindlichste Stadien sind die späte G_1-Phase und die S-Phase der Zellen (10, 11, 13, 21, 79).

Cyclophosphamid wird überwiegend oral appliziert. Es besitzt per se keine Antitumoraktivität, sondern muß durch oxidative Metabolisierung in der Leber über Aldophosphamid als Zwischenstufe in die stark toxischen Metabolite Phosphoramidmustard und Acrolein umgewandelt werden. Die Elimination erfolgt sehr langsam, größtenteils in Form inaktiver Metabolite über die Niere (13, 21, 79).

Zu den Nebenwirkungen (13, 21, 32)

An unerwünschten Wirkungen speziell auf die Leukozyten ist bekannt, daß nach Anwendung von Cyclophosphamid mit einer Latenz von ca. 10-14 Tagen eine erhebliche Leukopenie auftritt, die durch eine Schädigung der Leukozytenstammzellen im Knochenmark hervorgerufen wurde. Nach ca. 21 Tagen sind im peripheren Blut bereits wieder normale Leukozytenzahlen nachweisbar.

Außerdem finden sich in den peripheren Leukozyten der mit Cyclophosphamid behandelten Patienten einige Tage nach Therapiebeginn erstmals signifikant höhere Anzahlen von blaßblauen, zystenartigen Einschlußkörperchen (Döhlebodies) und von groben zytoplasmatischen Granulationen, die etwa zwei bis drei Monate lang nachweisbar bleiben (32). Eine weitere interessante, bisher jedoch ungeklärte Beobachtung zeigt, daß Cyclophosphamid offensichtlich die Erholung des durch andere Medikamente geschädigten Knochenmarks stimuliert (13).

4.5. Diskussion der Befunde

Die Untersuchungen wurden gemeinsam mit Markus Karutz durchgeführt, der die Chemotaxis/Migration der Granulozyten anhand von Boyden-Kammer und Agarosetest bearbeitete. Bezüglich der Normalkollektive ergab sich ein gravierender, von uns nicht erwarteter Unterschied bezüglich der Adhäsion, der Phagozytose und in gleicher Weise auch der Chemotaxis. Die Differenzen waren zwar teilweise nicht statistisch gesichert, hatten aber bei numerischer Auswertung immer den gleichen Trend und dürften (am ehesten) auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Probanden zurückzuführen sein. In der ersten Normgruppe (1 NG) waren Versuchspersonen beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 20 und 25 Jahren zusammengefaßt, in der 2. Normgruppe (2 NG) wurden ausschließlich klinisch gesunde Frauen zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr untersucht. Demgegenüber bestand bei den von uns untersuchten Funktionsparametern der Granulozyten zwischen der 2. Normgruppe (2 NG) und dem Patientinnenkollektiv (VT), in dem Frauen zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr mit metastasierendem Mammakarzinom vor Beginn der zytostatischen Therapie zusammengefaßt waren, kein wesentlicher Unterschied. Der von uns vergleichsweise eingesetzte NBT-Test zeigte in den drei genannten Kollektiven keine Abweichungen, wies jedoch eine Streuung bis zu 100 % der Ergebnisse auf.

Deutliche Unterschiede von Adhäsion und Phagozytose der Granulozyten ergaben sich jedoch nach erfolgter Injektion der Zytostatika Adriamycin und Vincristin. Die Untersuchungen konnten aus technischen und praktischen Gründen erst frühestens 15 Stunden nach Injektion durchgeführt werden, da die Zytostatikainfusionen wegen der subjektiven Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Völlegefühl prinzipiell in den Abendstunden vorgenommen

wurden, in denen die Voraussetzungen für Vorbereitung und Durchführung der Tests von insgesamt 10 Stunden nicht gegeben waren. Deshalb erfolgte die erste Blutabnahme bei den Patientinnen erst 12-15 Std. nach Injektion (Kollektiv 1 T) und die zweite Blutabnahme (Kollektiv 2 T) nach etwa 40 Stunden. Die Untersuchungsergebnisse nach Zytostatikainfusionen zeigen, daß bereits nach 15 Std. eine signifikante Adhäsionsverminderung zu beobachten ist, die sich vom 3. Tag an zunehmend wieder erholte. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Chemotaxisprüfung, die in der parallel angefertigten Promotionsarbeit von Markus Karutz erstellt wurde. Die Phagozytose von Staphylococcus aureus war 15 Std. nach Zytostatikainfusion noch nicht, aber nach 40 Std. signifikant erniedrigt und zeigte dann in den nachfolgenden Tagen noch keine Erholung. Die genannten Veränderungen ließen sich durchweg für die von uns geprüften granulozytären Funktionen in eindeutiger Abhängigkeit von der Zytostatikainfusion nachweisen. Die Abweichungen waren nicht immer statistisch signifikant - vor allem wohl durch die teilweise erheblichen Einzelstreuungen bedingt -, zeigten aber einen eindeutigen numerischen Trend, so daß ein Zusammenhang mit den verabreichten Zytostatika erwiesen sein dürfte. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Veränderungen direkt an den ausgereiften Granulozyten ansetzen. Dieser Befund läßt sich am ehesten auf die toxische Wirkung von Adriamycin zurückführen, dessen Hydrochinonstruktur zur Bildung rasch auftretender chemischer Radikale in der Lage ist. Die Untersuchungen wurden bewußt in den ersten Tagen nach der Zytostatikagabe durchgeführt, an denen toxische Knochenmarkschädigung und nachfolgende Neutropnie noch keine Rolle spielen konnten. Ein überlagernder Effekt von Vincristin ist nicht ausgeschlossen, da diese Substanz

zwar in die Zellmitose eingreift und damit eine mehrtägige Latenzzeit bis zum Auftreten einer Granulozytopenie hat, aber gleichzeitig einen Direkteffekt auf Muskelfibrillen und andere kontraktile Zellelemente besitzt. Nachfolgende Untersuchungen unter Verabreichung der Einzelsubstanzen werden die Frage zu klären haben.

Unsere Untersuchungen zeigen ferner - gemessen an der Bestimmung der granulozytären Einzelfunktionen - die ungenügende Aussagekraft des NBT-Tests, der in dem von uns gewählten Bereich eine zu starke Streuung der Einzelwerte zeigt.

Zusammenfassend ist feststellbar, daß anhand der von uns durchgeführten Versuchsansätze die Granulozytenfunktion bei Mammakarzinom nicht wesentlich eingeschränkt ist und durch Zytostatikagaben nur wenige Tage vermindert ist. Deshalb ist zu bezweifeln, daß dieser in vitro nachgewiesene medikamentenindizierte funktionelle Defekt der Granulozyten eine klinisch bedeutsame Infektanfälligkeit der Patientinnen bedingt. Die bei diesen Patientenkollektiven unter Zytostatikatherapie beobachtete Infektschwäche dürfte vielmehr auf die später einsetzende toxische Knochenmarkschädigung mit nachfolgender Granulozytopenie zurückzuführen sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Untersuchung granulozytärer Funktionen von Patientinnen mit metastasierendem Mammacarcinom unter zytostatischer Therapie mit Adriamycin, Vincristin und Cyclophosphamid fanden sich bei der Adhäsion, Phagozytose und Migration deutliche, teilweise signifikante Unterschiede zwischen den beiden Normgruppen. Diese beruhten unserer Meinung nach auf dem Einfluß von Alter und Geschlecht auf die Leukozytenfunktion. Die erste Normgruppe, bestehend aus Männern und Frauen im Verhältnis 1:1 und im Alter zwischen 20 und 25 Jahren lag im Durchschnitt höher als die zweite Normgruppe, die aus klinisch gesunden Frauen im Alter zwischen 40 und 60 Jahren bestand.

2. Zwischen der zweiten Normgruppe (klinisch gesunde Frauen zwischen 40 und 60 Jahren) und der Patientengruppe vT, bestehend aus Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Ca vor Beginn der zytostatischen Therapie ergab sich bei keinem der durchgeführten Tests ein signifikanter Unterschied.

3. Zumindest ein numerischer (aber nicht immer statistischer) Unterschied bestand zwischen der zweiten Normgruppe und den Patientinnen vor Therapie gegenüber den Patientenkollektiven 1T und 2T (15 bzw. 40 Stunden nach Beginn der zytostatischen Therapie) bei Adhäsion, Chemotaxis und Phagozytose.

4. Als unbrauchbar im Sinne unserer Fragestellung erwies sich der NBT-Test, da die mit ihm erzielten Meßergebnisse eine Streuung von bis zu 100 % aufwiesen.

5. Bei der Messung der Adhäsion wie auch der Chemotaxis zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Leukozytenfunktion nach dem dritten Tag. Bei der Phagozytose traten Abfall und erneuter Anstieg der Funktion verspätet auf; allerdings ist die Aussagekraft dieses Tests wegen der geringen Patientenzahlen sehr eingeschränkt.

6. Für die Veränderungen der Leukozytenfunktion lassen sich zwei Mechanismen als Erklärung anführen: Erstens zeigten Untersuchungen der Wirkung von Adriamycin auf intakte Zellen deutliche Veränderungen an der Zellmembran hinsichtlich Morphologie und Permeabilität, da Adriamycin aufgrund seiner Chinon-Hydrochinonstruktur gern Elektronen aufnimmt und dadurch Radikale bildet.

   Zweitens hat Vincristin über seine Bindung an Tubulin einen direkten Einfluß auf die Morphologie und Beweglichkeit der neutrophilen Granulozyten.

7. Die von uns gefundenen Verminderungen der Granulozytenfunktion nach Zytostatikagabe sind nur wenige Tage nachweisbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die bei diesen Patientinnen auftretende Infektanfälligkeit weniger auf dieser, in vitro nachgewiesenen Funktionsminderung der Granulozyten als vielmehr auf der später einsetzenden toxischen Knochenmarksschädigung mit nachfolgender Granulozytogenie beruht.

6. LITERATUR

(1) ATHERTON, A.; BORN, G. V. R.: Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. J. Physiol., 1972; 222: 447-474

(2) BABIOR, B. M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J. Med. 1978; 298: 659-68

(3) BAEHNER, R. L.; NATHAN, D. G.: Quantitative NBT-Test in chronic granulomatous disease. N. Engl. J. Med., 1968; 278: 971

(4) BAEHNER, R. L.: Microbe ingestion and killing by neutrophils: normal mechanisms and abnormalities. J. Clin. haematol. 1975; 4: 609

(5) BAEHNER, R. O.; BOXER, L. A.; DAVIS, J.: The Biochemical Basis of NBT-Reaction in Normal Human and chronic Granulomatous Disease Polymorphonuclear Leukocytes. Blood, 1976; 48: 309-13

(6) BENDER, R. A.: Vinca Alkaloide. In: PINEDO, H. M.: Cancer chemotherapy, The EORTC Cancer chemotherapy annual 1, Excerpta medica, 1979; S. 93-107

(7) BOYDEN, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med., 1962; 115: 453-466

(8) BRYANT, R. E.; SUTCLIFFE, M. C.: The effect of 3'5'-Adenosine-Monophosphate on granulocyte adhesion. J. Clin. Invest., 1974; 54: 1241-44

(9) CLARK, R. A. F.; GALLIN, J. I.; FAUCI, A. S.: Effects of in vivo Prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. Blood, 1979; 53: 633-641

(10) CLARYSSE, A.; KENIS, G. and MATHÉ, G.: Cancer Chemotherapy. In: Recent Results in Cancer Research, Vol. 53; Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976; 55-58

(11) CLARYSSE, A.; KENIS, G. and MATHÉ, G.: Classification of Chemotherapeutic agents according to their effect on the cell cycle. In Recent Results in Cancer Research, Vol. 53; Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976; 101-111

(12) CLINE, M. J.; GOLDE, D. W.: Granulocytes and Monocytes: function and functional disorders. In Resent advances in hematology, by HOFFBRAND, A. V.; BRAIN, M. C.; HIRSH, J. No. 2, 1977; Edinburgh, London, New York

(13) CONORS, T. A.: Alkylating drugs, nitrosaurea and dialcyltriazenes. In: PINEDO, H. M.: Cancer chemotherapy. The EORTC Cancer chemotherapy annual 1, Excerpta medica, Amsterdam, 1979; S. 25-56

(14) EHNINGER, G.; STOCKER, H.-J.; PROKSCH, B.; WILMS, K.: Die Pharmakokinetik von Adriamycin und Adriamycinmetaboliten. Klin. Wschr., 1980; 58: 927-34

(15) FEHR, G.; DAHINDEN, C.: Modulating influence of chemotactic factor-induced cell-adhesiveness on granulocyte function. J. Clin. Invest., 1979; 64: 8-16

(16) FERRANS, V. J.: Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. Cancer Treat. Rep., 1978; 62: 955-61

(17) FLIEDNER, V.; SALVATORI, V.; HIGBY, D. J.; STUKMANN, L.; PARK, B.: Polymorphonuclear leucocyte function in malignant lymphomas and effects of splenectomy. Cancer, 1980; 45: 469-475

(18) GALLIN, J. I.; CLARK, R. A. and KIMBALL, H. R.: Granulocyte chemotaxis: An improved in vitro assay employing 51-Cr.-labelled granulocytes. J. Immunol., 1973; 110: 233-240

(19) GARVIN, J. E.: Factors affecting the adhesiveness of human leucocytes and platelets in vitro. J. Exp. Med. 1961; 114: 51-73

(20) GOLDSTEIN, J. M.; CERQUEIRA, M.; LIND, St.; KAPLAN, H. B.: Evidence that the superoxide generating system of human leucocytes is associated with the cell surface. J. Clin. Invest., 1977; 59: 249-54

(21) GOODMAN GILMAN, A.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.: The Pharmacological Basis of therapeutics. Macmillan, N. Y., 1980; 1256-66

(22) ders.: 1287-90

(23) ders.: 1290-93

(24) GRANT, L.: The sticking and emigration of white blood cells in inflammation. In: ZWEIFACH, B. W.; GRANT, L.; McCLUSKY, R. J.: The inflammatory process. Academic Press, N. Y., 1965; 190

(25) GREENE, W. H.: Supporive Care in the Cancer Patient. Kap. Infection. In: BECKER, F. F.: Cancer 5, Plenum Press N. Y., London, 1977; 238-61

(26) GRIFFIN, F. M.; GRIFFIN, J. A.; SILVERSTEIN, S. C.: Studies on the mechanism of phagocytosis II. The interaction of macrophages with Antiimunglobulin IgG-coated bone narrow-derived lymphocytes. J. Exp. Med., 1976; 144: 788-807

(27) GROGAN, J. B.; PARKS, L. C.; MINABERRY, D.: Polymorphonuclear leucocyte function in cancer patients treated with total body hyperthermia. Cancer, 1980; 45: 2611-15

(28) HAIM, N.; OBEDEANU, N.; MESHULAM, T.; ROBINSON, E.; SCHREIBER, H.; MERZBACH, D.: Neutrophil function in cured cancer patients. Cancer, 1977; 40: 2273-77

(29) HAIM, N.; OBEDANU, N.; MESHULAM, T.; ROBINSON, E.; MERZBACH, D.: Spontaneous and stimulated NBT-Tests in patients with solid malignant tumors. J. Clin. Pathol. 1977; 30: 685

(30) HENDERSON, C. A.; METZ, E. N.; BALCERAK, S. P.; SAGONE, A. L.: Adriamycin and Daunomycin generate reactive oxygen compounds in erythrocytes. Blood, 1978; 52: 878-85

(31) HIRSCH, J. G.: Cinemicrophotografic observation on granule lysis in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. J. Exp. Med., 1975; 116: 827

(32) ITOGA, T.; LASZLO, J.: Döhle bodies and other granulocytic alterations during chemotherapy with cyclophosphamide. Blood, 1962; 20: 668-74

(33) JARSTRAND, C.; ANGELIN, B.; EINARSSON, K.: Decreased nitroblue tetrazolium reduction of granulocytes in type IV hyperlipoproteinemia. J. Lab. Clin. Med., 1979; 94: 897-901

(34) JOHN, M.: Der NBT-Test - eine Übersicht. Fol. haematol., 1980; 107: 358-71

(35) JONES, S. E.; DURIE, B. G. M.; SALMAN, S. E.: Combination chemotherapie with adriamycin and cyclophosphamide for advanced breast cancer in: Cancer 36: 90-97, 1975

(36) LEHRER, R. J.; CLINE, M. J.: Leucocyte candidacidal activity and resistance to candidiasis in patients with cancer. Cancer, 1971; 27: 1211-17

(37) LENTNEK, A. L.; SCHREIBER, A. P.; McGREGOR, R. R.: The induction of augmented granulocyte adherence by inflammation. J. Clin. Invest.; 1974; 57: 1098-1103

(38) LISO, V.; SPECCHIA, G.; TROCCOLI, G.: Evaluation of non-stimulated Nitroblue-Tetrazlium Test in Patients with Malignant Lymphomas. Blut, 1978; 37: 313-17

(39) LOHRMANN, H. P.; SCHREML, W.: Early and late effects of adjuvant chemotherapy (Adriamycin/Cyclophosphamide) on the human grnulopoesis in Hematology and Blood Transfusion. J. Blood Res., 1979: 24: 111-122

(40) MALPAS, J. S.; WHITEHOUSE, J. M. A.: Cytostatics and immunosuppressive drugs. In: DUKES, M. N. G.: Mylers Side effects of drugs, Annual 2, Excerpta Medica, Amsterdam, 1978; 362-372

(41) MATULA, G.; PATERSON, P. G.: Spontaneous in vitro reduction of NBT by neutrophils of adult patients with bacterial infection. N. Engl. J. Med., 1971; 285: 311-17

(42) MATULA, G.; PATERSON, P. G.: NBT-Tests in a patient on steroids. Lancet I, 1971; 803-4

(43) McGILLEN, J.; PHAIR, J.: Polymorphonuclear leucocyte adherence to nylon: effect of oral corticosteroids. Infection and Immunity, 1979; 26: 542-46

(44) McGILLEN, J.; PATTERSON, R.; PHAIR, J. P.: Adherence of polymorphonuclear leucocytes to Nylon: Modulation by Prostacyclin (PGI_2), Corticosteroids and Complement Activation. J. Inf. Disease, 1980; 141: 382-88

(45) McGREGOR, R. R.; SPAGNUOLO, P. J.; LENTNEK, A. L.: Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirine, measured with an assay system. N. Engl. J. Med., 1974; 291: 642-46

(46) McGREGOR, R. R.: The effect of anti-inflammatory agents and inflammation on granulocyte adherence. Am. J. Med., 1976; 61: 597-606

(47) McRIPLEY, R. J.; SELVARAI, R. J.; GLOVSKY, M. M.; SBARRA, A. J.: The role of the phagocyte in host-parasite interactions V. Phagocytic and bactericidal activities of leucocytes from patients with different neoplastic disorders. Cancer Res., 1967; 27: 674-85

(48) MIALE, J. B.: Laboratory Medicine Hematology. Mosby Comp., St. Louis, 1977; 759-90

(49) MÜLLER, S.; ERNST, T.-M.: Studies of cellular mediated immunity in malignant melanoma patients by leucocyte adherence inhibition test. Arch. Derm. Res., 1980; 268: 167-81

(50) MURPHY, P.: The Neutrophil. Plenum Medical Book Comp., N. Y., London, 1976; 125-175

(51) MYERS, C. E.; McGUIRE, W. P.; LISS, P. H.; IFRIM, I.; GRAKINGER, L.; YOUNG, P. C.: Adriamycin. The role of lipid-peroxidation in cardiac toxity and tumor response. Science, 1977; 197: 165-167

(52) MYERS, C. E.: Antitumor antibiotics I: Anthracyclines. In: PINEDO, H. M.: Cancer chemotherapy. The EORIC Cancer chemotherapy annual 1; Excerpta medica, Amsterdam, 1979; 56-74

(53) NATHAN, D. G.: NBT-Reduction by human phagocytes. N. Engl. J. Med., 1974; 290: 280-81

(54) NELSON, R. D.; QUIE, P. G. and SIMMONS, R. L.: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. J. Immunol., 1975; 115: 1650-1656

(55) NIETHAMMER, D.; WILDFEUER, A.; KLEIHAUER, E.; HAFERKAMP, O.: Übersichten: Granulozytendysfunktion 1. Angeborene Störungen. Klin. Wschr., 1975; 53: 643-52

(56) NIETHAMMER, D.; WILDFEUER, A.; KLEIHAUER, E.; HAFERKAMP, O.: Übersichten: Granulozytendysfunktion 2. Erworbene Störungen. Klin. Wschr., 1975; 53: 739-46

(57) NIETHAMMER, D.; HEINZE, E.; TELLER, W.; KLEIHAUER, E.; WILDFEUER, A.; HAFERKAMP, O.: Impairment of granulocyte function in iuvenile diabetics. Klin. Wschr., 1975; 53: 1057-60

(58) PARK, B. H.; FICKRIG, S. M:; SMITHWICK, E. M.: Infection and NBT-reduction by neutrophils. A diagnostic aid. Lancet II, 1968; 532-34

(59) PENNY, R.; GALTON, D. A. G.; SCOTT, J. T.; EISEN, V.: Studies on neutrophil function. I. physiological and pharmacological aspects. J. Hematol., 1966; 12: 263

(60) PONDER, E.: The physical factors involved in phagocytosis. Protoplasma, 1928; 3: 611

(61) QUIE, P. G.: Pathology of bactericidal power of neutrophils. Sem. Hematol., 1975; 12: 143-60

(62) RABINOWITZ, J.: Adherence and separation of leucemic cells on glass bead columns. Blood, 1965; 26: 100-03

(63) RICHARDSON, P. O.: Dynamic theory of leucocyte adhesion. In: Blood cells and vessel walls: functional interactions. Ciba foundation symposium 71, 1980; 313-35

(64) RISTER, M.: Granulocytäre Phagozytosestörungen. Dtsch. Med. Wschr., 1979; 104: 1535-1539

(65) SAGONE, A. L.; GURTON, G. M.: the effect of BCNU and Adriamycin on normal and G-6-P-D-deficient erythrocytes. Am. J. Hem., 1979; 97-106

(66) SCHREINER, A.; HOPEN, G.: Adhesion and locomotion of human leucocytes in vitro; importance of protein coating; effect of lidocain, ethanol and endotoxin. Acta path. microbiol. Scand. C., 1979; 87: 333-40

(67) SIGMA. Technical Bulletin No. 840: Nitroblue Tetrazolium Reduction in Neutrophils, 1978

(68) SMITH, C. W.; HOLLERS, J. C.; PATRICK, R. A.; HASSETT, C.: Motility and adhesiveness in human neutrophils. J. Clin. Invest., 1979; 63: 221-29

(69) SMITH, C. W.; HOLLERS, J. C.: Motility and adhesiveness in human neutrophils. J. Clin. Invest. 1980; 65: 804-12

(70) SNYDERMAN, R.; PIKE, M. C.: Pathophysiologic Aspects of Leucocyte Chemotaxis: Identification of a specific chemotactic Reactor Binding Site on Human Granulocytes and Defects of Macrophage Function Associated with Neoplasia. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leucocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and clinical Implication. Raven Press, N. Y., 1978; 357-378

(71) SPAGNUOLO, P. J.; ELLNER, J. J.: Salicylate blockade of granulocyte adherence and the inflammatory response to experimental peritonitis. Blood, 1979; 53: 1018-1022

(72) STEIGBIGEL, R. T.; JOHNSON, P. K.; REMINGTON, J. S.: The NBT-Test versus conventional hematology in the diagnosis of bacterial infection. N. Engl. J. Med., 1974; 290: 235-38

(73) STEIGBIGEL, R. T.; LAMBERT, L. H.; REMINGTON, J. S.: Polymorphonuclear leucocyte, monocyte and macrophage bactericidal function in patients with Hodgkin's disease. J. Lab. Clin. Med., 1976; 88: 54-62

(74) STOSSEL, T. P.: Phagocytosis: recognition and ingestion. Sem. Hematol., 1975; 12: 82

(75) STOSSEL, T. P.; TAYLOR, M.: Phagocytosis.In: Manuals of clinical immunology, 1976; 148-54

(76) STOSSEL, T. P.: Phagocytosis. In: The Granulocyte: Function and Clinical Utilisation. Progress in Clin. and Biol. Res., N. Y., 1977; 13: 87-102

(77) STRAUSS, R. R.; PAUL, B. B.; JACOBS, A. A.; SIMMONS, C.; SBARRA, A. J.: The metabolic and phagocytic activities of leucocytes from children with acute leucemia. Cancer Res., 1970; 30: 480-88

(78) STUART, N. J.; de ALARCON, P. A.; BARESINCHAK, M. K.: Inhibition of Adriamycin-induced human platelet lipid peroxidation by Vit. E. Am. J. Hem., 1978; 5: 297-303

(79) TATTERSALL, M. H. N.: Anticancer Drugs: Mode of action and pharmacokinetics. In HOFFBRAND, A. V.; BRAIN, M. C.; HIRSH, J.: Recent Advances in Hematology. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1977; 325-348

(80) TAYLOR, A. C.: Attachment and spreading of cells in culture. Exp. Cell. Res., 1961; Supp. 8: 154-73

(81) TERRITO, M. C.; CLINE, M. J.: Monocyte function in man. J. Immunol., 1977; 118: 187-192

(82) TSOU, K. C.; CHENG, C. S.; NACHLASS, M. M.; SELIGMANN, A. A.: Synthesis of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. J. Am. Chem. Soc., 1956; 78: 6139

(83) URBANITZ, D.; FECHNER, U.; GROSS, R.: Nitroblau-Tetrazolium-Test bei isolierten menschlichen Monocyten. Blut, 1975; 30: 187-198

(84) WILMS, K.; RÜCKLE, H.: Die zytostatische Chemotherapie des Mammakarzinoms. Krankenhausarzt, 1976,49: Heft 8

(85) WILMS, K.; RÜCKLE, H.; LÖFFLER, B.: Richtlinien zur Behandlung des metastasierenden Mamma-Ca. Unveröffentlichtes Material der Universitätsklinik Tübingen, Protokoll 5/76

Lebenslauf

Ich, Renate Karutz, geb. Knapp, wurde am 17.5.57 als Tochter des Dipl. Physikers Dr. Heinrich Knapp und der Apothekerin Gisela Knapp, geb. Lohse, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren.

1964 wurde ich in die Mörike-Schule in Leonberg-Eltingen eingeschult; von dort wechselte ich 1967 auf das Johannes-Kepler--Gymnasium in Leonberg über, wo ich 1976 das Abitur bestand.

Zum Wintersemester 1976/77 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Ulm. Nach dem Physikum wechselte ich nach Tübingen. Dort absolvierte ich im Sommersemester 79 den ersten und im Wintersemester 81/82 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung. Während des siebten bis elften Semesters schrieb ich meine Dissertation im Fachbereich Innere Medizin der Universität Tübingen.

Das Praktische Jahr absolvierte ich in Esslingen mit Pädiatrie als Wahlfach. Dort bestand ich auch am 18. April 1983 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Am 11. September 1982 heiratete ich den Medizinstudenten Markus Karutz.